

-オリザノールの吸収ならびに生体内動態に関する食品機能学的研究

著者	小林 エリ
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301
URL	http://hdl.handle.net/10097/00133387

博士論文内容要旨

γ -オリザノールの吸収ならびに
生体内動態に関する食品機能学的研究

Food functional studies on absorption and
biokinetics of γ -oryzanol

東北大学大学院農学研究科
生物産業創生科学専攻

小林エリ

指導教員 仲川 清隆 教授

緒言

野菜や果物などの食用植物には様々な機能性成分が含まれており、医薬品と比較して副作用などのリスクが低いことから、食事を通じたこれらの日常的な摂取による疾患の改善や予防が注目されている。例えば、緑茶に含まれるカテキンには小腸での脂質の乳化と吸収を抑制する作用があり、高濃度カテキンを含む緑茶の摂取により内臓脂肪を低下させる飲料製品などが人気である。こうした機能性成分の効果を最大限に享受するためには、摂取後に体内でどのように吸収・代謝され、どのような形態で体内に分布し生理作用を発揮するのか、すなわち活性本体を理解することが重要である。しかし、トコフェロールやポリフェノール、特定のカロテノイドなどの非常に有名ないくつかの機能性成分を除いて、吸収代謝の理解は十分ではないことが多い。

γ -オリザノール (OZ) は、種々の植物ステロールやトリテルペンアルコールのフェルラ酸エステルの総称である。OZ は、1954 年に金子らによって米糠中で最初に同定され[1]、その後小麦、大麦、トウモロコシなどのいくつかの穀物中でも存在が確認され、現在までに 10 種類以上の OZ 分子種が報告されている。中でも、米糠は OZ を非常に多く含み、粗米糠油中に 1.5~3%程度の OZ が含まれている[2]。米糠中の主要な OZ 分子種としては cycloartenyl ferulate (CA-FA)、24-methylenecycloartanyl ferulate (24MCA-FA)、campesteryl ferulate (Camp-FA)、および β -sitosteryl ferulate (Sito-FA) が挙げられる (Fig. 1)。OZ は抗酸化作用や抗発癌作用、抗糖尿病作用、神経保護作用、免疫調節作用および脂質低下作用などの優れた機能性を有しており[3-8]、米糠やそれを加工したこめ油の日常的な摂取による健康増進効果が大いに期待される。

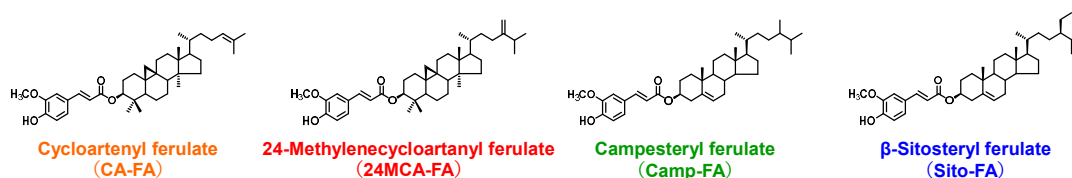


Fig.1 米糠に含まれる主要な OZ 分子種

OZ がヒトの生体に及ぼす生理活性には多くの関心が寄せられてきた一方で、経口摂取した OZ の生体内動態に関する研究報告は多くなく、未だ不明な点が多い。1980 年に藤原らが行った OZ の体内動態の調査では、家兎に ^{14}C 標識 OZ を経口投与 (200 mg / kg 体重) すると、その後の血中には OZ そのものではなく、代謝物 (フェルラ酸) に由来する放射能が約 80%含まれていたことが報告された[9]。これは、OZ が生体内ですぐに加水分解を受け、体内ではフェルラ酸として存在していることを示唆していた。以降、OZ の吸収代謝に関する研究では、OZ そのものではなく代謝物であるフェルラ酸に焦点が当てられるようになった。我々の知る限り、薄層クロマトグラフィーを使用した 1 つの研究を除いて[10]、経口投与後の血中の OZ の存在を確認した研究は

無い。この傾向とは対照的に、細胞試験などによる OZ の活性評価研究では OZ そのものを添加した評価が行われており[6,11,12]、代謝物ではなく OZ としても生理活性があることは自明である。

近年の分析技術の発達により、以前は困難とされてきた多くの微量分子の精密解析が可能となった。その中で、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）とタンデム質量分析（MS/MS）を組み合わせた分析手法（HPLC-MS/MS）は、夾雑物が多く存在するサンプル中での高選択的・高感度な分析に適しており、特定の分子の構造同定および濃度測定に広く利用されている[13,14]。OZ の測定においても、米糠中の OZ の分析に HPLC-MS/MS が利用された実績があり、その有用性が証明されている[15,16]。しかし、生体サンプル中の OZ に対してこの技術を適用した例は無く、これを血漿や組織などの測定に応用することで、OZ の生体内動態の解明に利用できると考えた。

以上より、本研究では、HPLC-MS/MS による生体内の OZ の抽出および分析法を構築し、OZ そのものが生体内に存在するかを評価した。

第1章 マウスへの OZ 単回投与後の血漿中 OZ の評価

【背景・目的】機能性成分の作用を最大限に享受するためには、摂取した成分がどのような形態で体内に取り込まれるかを知ることが重要である。こめ油中の優れた機能性成分として知られる OZ は、従来の学説では経口摂取後に体内で速やかにフェルラ酸へ分解されるとされており[9]、OZ そのものが体内にどの程度存在しているかは評価されてこなかった。そこで本研究では、先ず、未代謝の OZ が体内に存在するのかを確かめるため、HPLC-MS/MS の Multiple reaction monitoring (MRM) 解析を用いた生体サンプル中の OZ の分析法を構築し、こめ油由来の OZ 濃縮物を与えたマウスの血漿の分析を行った。

【方法】OZ の 1 つである CA-FA 標品を用いて HPLC-MS/MS のイオン化条件を最適化し、推測される MRM ペアを設定してこめ油中の代表的な 4 種の OZ (CA-FA、24MCA-FA、Camp-FA、Sito-FA) の分析法を構築した。次いで、OZ 濃縮物 (CA-FA 当量として約 60% の OZ を含有) を大豆油に 10% (w/w) の濃度で溶解し、投与サンプルを作成した。C57BL/6J マウスを 16 時間絶食させた後、投与サンプルを単回投与 (600 mg OZ 濃縮物 / kg 体重) し、対照群には大豆油のみを投与した。投与 5 時間後の血漿を採取し、Folch 法により総脂質を抽出した後、HPLC-MS/MS により血漿中 OZ を測定した。

【結果と考察】OZ 濃縮物を HPLC-MS/MS で解析した結果、保持時間 10.1 分で明瞭な CA-FA の単一ピークが検出され、次いで 11.2、12.0 分にも Camp-FA、Sito-FA の単一ピークが検出された (Fig. 2)。24MCA-FA の MRM ペアでは、保持時間 10.8~11.8 分に 3 つのピークが検出され、24MCA-FA に加えて 2

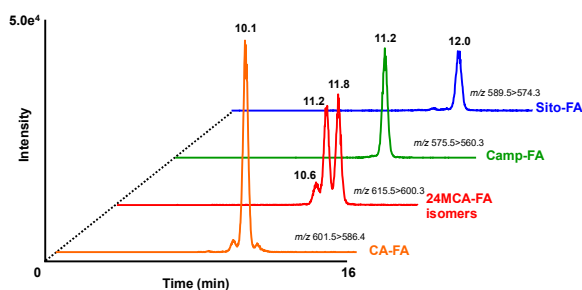


Fig.2 OZ 濃縮物の HPLC-MS/MS 解析

種の 24MCA-FA 異性体が含まれていることが示唆された。後に、当研究室の澤田らによってこの 2 つの化合物はこめ油の製造過程に 24MCA-FA が異性化して生じる異性体 (cyclobranyl ferulate および cyclosadyl ferulate) であることが証明され[17]、新しい OZ として報告された。本研究は、この 2 つの新規 OZ を生体内から検出した最初の報告であった。

次いで、血漿中の OZ を解析したところ、対照群の血漿からは OZ がほとんど検出されなかったのに対して (Fig. 3A)、OZ 投与群の血漿からは生理作用が期待できる濃度の OZ が検出された (CA-FA 当量として、CA-FA: 17.6 ng/mL、24MCA-FA 異性体: 28.2 ng/mL、Camp-FA: 15.6 ng/mL、Sito-FA: 5.1 ng/mL、Fig. 3B) [18]。このことより、単回投与した OZ は、完全に分解されてしまうのではなく、一部はそのままの形で吸

収され、5 時間後も十分な濃度で血中に存在することが明らかとなった。

以上より、本研究では OZ の HPLC-MS/MS 分析法を構築し、生体サンプル（血漿）中の OZ を分子種レベルで初めて測定した。血漿から OZ が検出されたことは、OZ の生理作用（抗酸化、抗炎症、脂質代謝改善作用など）には代謝物だけではなく OZ 自身も関与している可能性を示唆し、OZ の吸収代謝に関する新たな見解を提示した。構築した分析法は、組織などの他の生体サンプルにも適用できる可能性が高く、OZ の生体内動態の解明に有用であることが期待される。

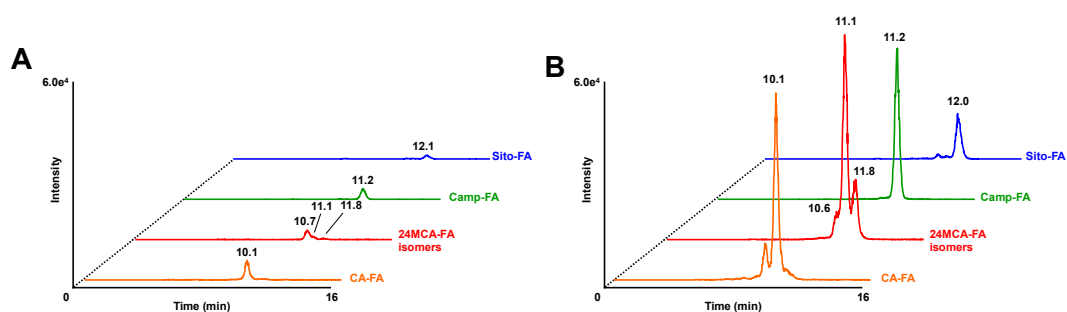


Fig.3 血漿中 OZ の HPLC-MS/MS 分析 (OZ 非投与群 (A)、OZ 投与群 (B))

第2章 肥満モデルマウスへのOZ長期給餌による脂質代謝改善とOZ蓄積の評価

【背景・目的】第1章では、HPLC-MS/MSを用いて、マウスに投与したOZの一部がそのままの形で血中へ移行することを明らかにした[18]。このことから、摂取したOZは完全に分解されて代謝物（フェルラ酸）として存在するのではなく、一部は血中にそのままの形で取り込まれ、生体内で生理作用（脂質代謝改善作用など）を発揮しているという仮説が提示された。この仮説の検証には、まず、生理作用発現部位における未代謝のOZの存在を確認する必要がある。そこで本研究では、OZ含有量の異なる2種のこめ油を肥満モデルマウスに長期摂取させ、HPLC-MS/MSを用いて血漿のOZ濃度および臓器のOZ蓄積量を解析した。さらに、血漿やOZ蓄積量の多かった臓器について生化学パラメータを測定することで、生理作用の発現とOZ蓄積量の関係を明らかにしようとした。

【方法】試験油として、一般的なこめ油（RBO、0.17%（w/w）OZ含有）およびOZを高含有するこめ油（HOZ、1.36%（w/w）OZ含有）を用いた。2つの試験油は、OZ含有量以外に差は無かった。脂質源として7%（w/w）の大豆油を含有する市販飼料AIN93Gの組成を改変し、脂質源を20%（w/w）の各試験油（RBO、HOZ、対象として大豆油（SO））に置き換え、コーンスターチを減らして重量調整をした高脂肪食を作製した（RBO-HF、HOZ-HF、SO-HF）。これらの高脂肪食および通常食（AIN93G）をC57BL/6Jマウス（3週齢、雄性）に与えて8週間飼育し、12時間の絶食後に血漿と組織（肝臓、脳、腎臓、膵臓、脾臓、筋肉、腎周囲脂肪組織、精巣周囲脂肪組織、腸間膜周囲脂肪組織）を採取した。定量性向上のためにOZのHPLC-MS/MS分析条件を最適化した後、血漿および各組織中のOZ含量を定量し、体内へのOZの分布を調べた。次いで、血漿と肝臓の生化学パラメータを測定し、OZの蓄積と生理作用発現との関係性を評価した。

【結果と考察】飼料組成の違いは試験期間中の摂取カロリーおよび試験終了時の体重と臓器重量に影響を与えなかった。AIN93G群と比較して、SO-HF群では腎周囲脂肪組織重量が増加する傾向が見られ（Fig. 4A）、高脂肪食の摂取により脂肪の蓄積が増加したことが確認された。RBO-HF群とHOZ-HF群の腎周囲脂肪組織重量はSO-HF群と比べて低値となり、特にHOZ-HF群では有意に低かった（Fig. 4A）。精巣周囲脂肪組織重量においても同様の傾向が見られた（Fig. 4B）。本結果より、こめ油（RBOとHOZ）を摂取した場合は、大豆油を摂取した場合と比較して脂質の蓄積が抑制され、特にHOZ-HF群でその傾向が顕著であったことから、OZの寄与が示唆された。

OZのHPLC-MS/MS解析の結果、RBO-HFおよびHOZ-HF群の血漿と全ての組織からOZが検出され、その濃度はRBO-HF群と比較してHOZ-HF群で有意に高かった（Fig. 5）。OZ濃度は、特に肝臓で著しく高く（Fig. 5B）、脳では低値を示した（Fig. 5C）。AIN93G群およびSO-HF群の血漿および臓器からはOZが検出されなかった。本

研究により、摂取した OZ は血中にそのままの形で移行した後、体内に広く分布し、各組織に蓄積されていることが明らかとなった[19]。OZ の分子種ごとの蓄積量は臓器ごとに異なり、OZ の蓄積のされ方には差があることが示唆された。

HOZ-HF 群の血漿中トリアシルグリセロール濃度は、RBO-HF 群と比較して有意に低く (Fig. 6A)、血漿中コレステロールおよびリン脂質濃度も同様の傾向を示した (Fig. 6B, C)。これらの現象には、HOZ に多く含まれる OZ の関与が示唆された。また、HOZ-HF 群の血漿中では OZ 濃度が高かったことから、生理作用の発現に OZ が関与した可能性が指示された。肝臓中脂質含量は群間で差はなかった。

以上より、OZ 摂取量依存的に脂質の蓄積が抑制され、血中の脂質濃度が低下したことが明らかとなった。脂質代謝の改善が見られた血漿や脂肪組織中から未代謝の OZ が検出されたことは、OZ の生理作用の発現には代謝物だけではなく OZ 自身も関与しているという仮説を支持した。現在は、ヒトでも同様の結果が得られるのかを調べるため、玄米を長期摂取したヒト血中の OZ の解析を進めている。

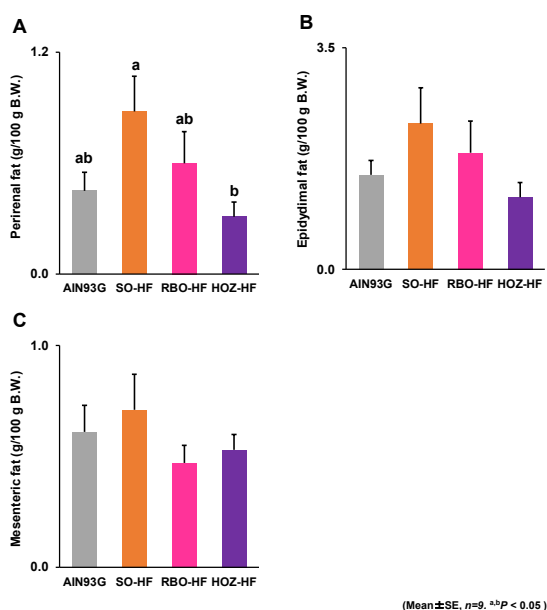


Fig. 4 脂肪組織重量（腎周囲脂肪組織（A）、精巣周囲脂肪組織（B）、腸間膜周囲脂肪組織（C））

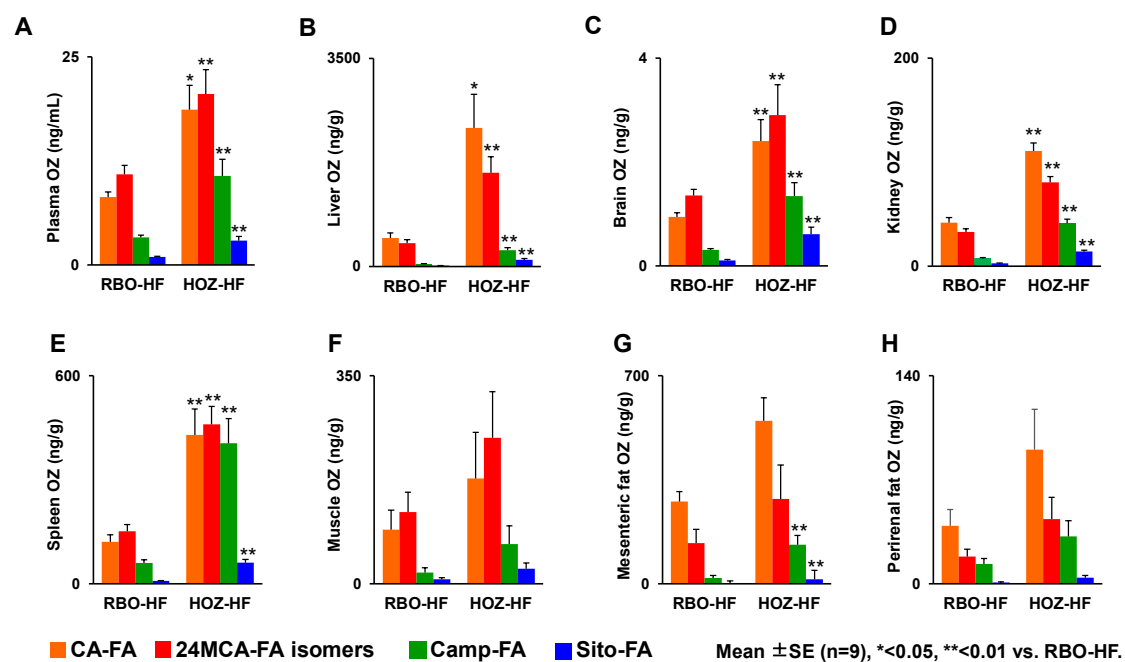


Fig. 5 血漿 (A) および各組織中の OZ 含量 (肝臓 (B)、脳 (C)、腎臓 (D)、脾臓 (E)、筋肉 (F)、腎周囲脂肪組織 (G)、腸間膜周囲脂肪組織 (H))

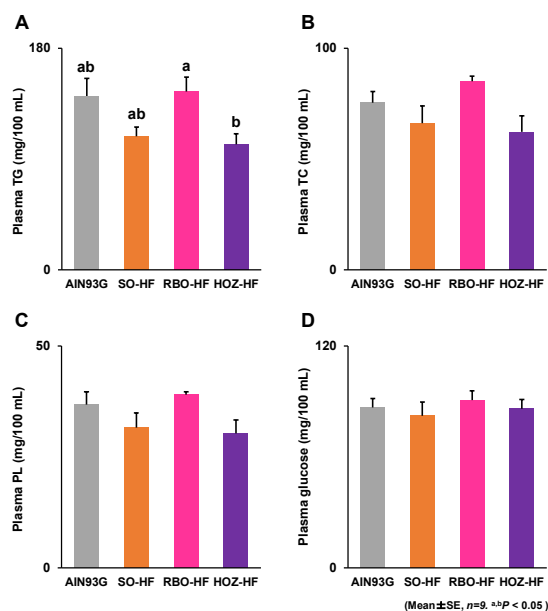


Fig. 6 マウス血漿の生化学パラメータ (TG, トリアシルグリセロール (A)、TC, 総コレステロール (B)、PL, リン脂質 (C)、グルコース (D))

第3章 ラット胸管リンパカニュレーション試験による OZ の腸管吸収の評価

【背景・目的】摂取した脂質や脂溶性物質は、消化やエマルションの形成を経て腸管から吸収された後、腸管リンパを経由して胸管リンパから静脈に入り、全身へと運ばれる。第2章までに、経口摂取した OZ は、少なくとも一部は分解されずにそのままの形で血中に移行し、広く組織に蓄積することを明らかにした[18,19]。このことから、血中や組織中に存在した一部の OZ は、代謝を受けずに腸管からそのままの形で吸収され、リンパ系を経由して血中に移行したことが予想された。そこで、第3章では、OZ の腸管吸収を評価することを目的とし、胸管リンパカニュレーション試験を実施し、リンパ液中の OZ を HPLC-MS/MS により解析した。

【方法】Sprague-Dawley 系ラット（8週齢、雄性）に胸管リンパカニュレーション手術を施し、腸管から吸収された脂溶性物質が血中に移行する直前でリンパ液を回収した（Fig. 7）。投与前2時間分のリンパ液をブランクとして回収した後、OZ 濃縮物 1 mg を含む投与エマルジョンをラットの胃に注入し、経時的にリンパ液を全量回収した。次いで、リンパ液用に OZ の分析条件を最適化し、回収したリンパ液中の OZ を HPLC-MS/MS で解析した。

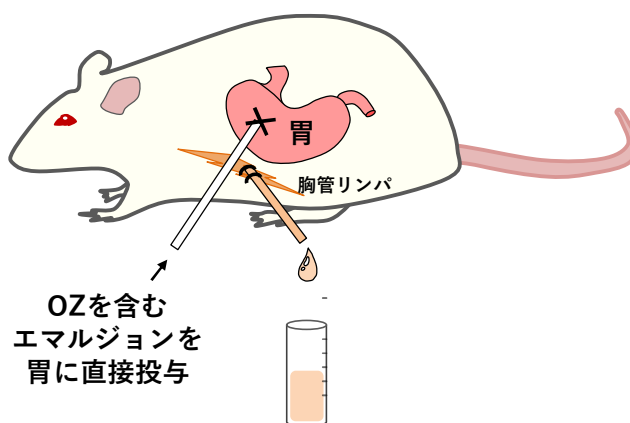


Fig. 7 胸管リンパカニュレーション試験

【結果と考察】最適化した条件での HPLC-MS/MS のイオン化率は、CA-FA 100.3%、24MCA-FA 92.7%、Camp-FA 94.0%、Sito-FA 92.0%であり、リンパ液中の夾雑物が MS のイオン化率に影響を与えないことを確認した。添加回収率は CAFA 99.9%、24MCA-FA 113.9%、Camp-FA 103.2%、Sito-FA 100.4%といずれも高回収率であった。これにより、リンパ液中の OZ の分析条件を構築することができた。試験中の経過時間と総リンパ流量は比例関係となり、リンパ液流量が安定であることが確認できた。リンパ液の HPLC-MS/MS 解析の結果、ブランクのリンパ液からは OZ がほとんど検出されなかったのに対して（Fig. 8A）、OZ を含むエマルジョン投与後のリンパ液からは明瞭に OZ が検出された（Fig. 8B）。このことから、OZ はそのままの形で確かに腸管吸収をされることが明らかとなった。胸管リンパへの OZ の累計移行量は、分子種ごとに差はあるものの、投与 6-9 時間後まで上昇し、12 時間後にはプラトーに達した。

本研究により、リンパ液中の OZ を HPLC-MS/MS で初めて解析し、摂取した OZ の少なくとも一部はそのままの形で腸管からリンパ系に移行することが明らかになっ

た。現在は、OZ の代謝物のうち、脂溶性物質（リンパ系による吸収）である植物ステロールについても解析を行っている。

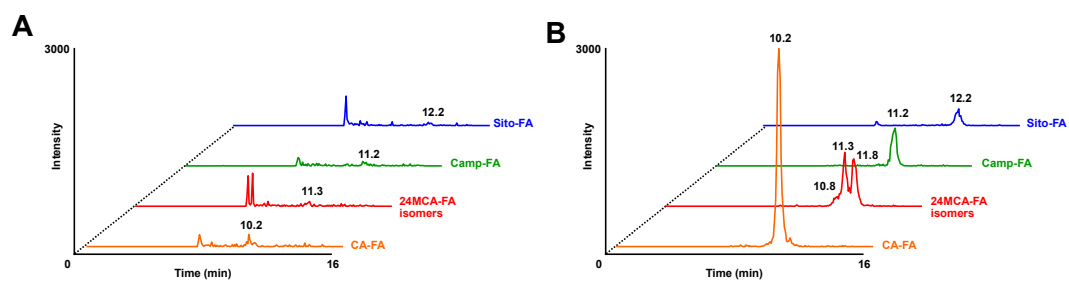


Fig.8 リンパ液中 OZ の HPLC-MS/MS 分析 (OZ 投与前 (A)、OZ 投与後 (B))

総括

本研究では、OZ の HPLC-MS/MS 解析技術を生体サンプルに初めて適用することで、これまであまり注目されてこなかった生体内の OZ そのものの存在を評価し、OZ の吸収および生体内動態の更なる解明を目指した。

第 1 章では、血中の OZ の存在を調べるために、こめ油由来の OZ 濃縮物をマウスに単回投与した後の血漿中 OZ を解析した。非投与群と比較して、OZ 投与群では血中の OZ 濃度が顕著に増加し、その濃度は生理作用を発揮し得る十分な濃度であった。このことは、従来の「摂取した OZ は体内で速やかに代謝されてフェルラ酸として存在する」という学説に対し、「摂取した OZ の一部はそのままの形で血中に移行し、十分な濃度で血中に存在する」という新たな知見を提示した。また、OZ の生理作用発現には、代謝物のみならず OZ そのものも関与する可能性を示唆した。

第 2 章では、摂取した OZ の一部はそのままの形態で生理作用発現に関与しているという仮説を検証するため、OZ を多く含むこめ油をマウスに長期摂取させた際の体内への OZ 蓄積と脂質代謝改善との関与を評価した。結果として、OZ を摂取したマウスの血漿と全ての組織から OZ が検出され、OZ 摂取量が多い群では有意に OZ 蓄積量が高かった。OZ を多く摂取した HOZ-HF 群では、脂肪の蓄積が抑制され、血中の脂質濃度が低下する結果が得られ、OZ の摂取が脂質代謝の改善に関与したことが示唆された。生理作用の発現が認められた血漿と脂肪組織から未代謝の OZ が検出されたことは、生理作用の発現には代謝物に加えて OZ 自身も関与しているという仮説を指示した。さらに、肝臓では非常に多くの OZ の蓄積が認められた一方で、脳での蓄積は非常に少ないなど、臓器ごとに OZ の蓄積に差があることを見出した。現在は、ヒトにおける玄米の長期摂取試験を行い、血中の OZ を測定することで、ヒトでも同様の結果が得られるかを検討している。

第 3 章では、第 1 章と第 2 章で検出された生体内の OZ が、腸管でそのままの形で吸収されるかを調べるため、ラットの胸管リンパカニューレーション試験を実施し、OZ 投与後のリンパ液中の OZ を解析した。その結果、OZ 投与後のリンパ液からは確かに OZ が検出され、摂取した OZ の一部がそのままの形で腸管から吸収されたことを明らかにした。現在は、OZ の脂溶性代謝物である植物ステロールについても解析を行っている。

本研究によって、生体内の OZ を分子種ごとに高感度で解析することが可能となり、OZ の一部はそのままの形で腸管吸収されて血中に移行し、血中や臓器に存在することを明らかにした。OZ の吸収代謝を解明するためには、代謝物（フェルラ酸や植物ステロールなど）の解析も必要であり、当研究室にて現在代謝物も含めたさらなる解析を進めている[20]。本研究の成果は、こめ油をはじめとする米糠加工品による健康増進の普及に大きな貢献をもたらすことが期待される。